Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody CELISA

BACKGROUND

Lymphatic filariasis (LF), caused by the filarial worm, *Wucheria bancroftii,* and transmitted through a mosquito vector, affects more than 100 million people in more than 83 countries worldwide[1]. A further billion people are at risk from the infection, which in its chronic stage (elephantiasis) has profound physical, social, and economic consequences, and represents the worldÕs fourth leading cause of permanent disability. The disease has been targeted by the WHO for eradication by the year 2020 through an international programme of mass drug administration (MDA)[2] operated by affected countries in collaboration with the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis (GAELF).

To monitor the effectiveness of the LF eradication programme a number of diagnostic tools have been employed, including microfilaremia quantitation and parasite antigen immunoassays, both of the rapid and ELISA format. Specific IgG4 antiÏ filarial antibodies have also been proposed as an effective marker for interruption of LF transmission, particularly in young children[3].

The Bm14 Antibody CELISA Kit is an indirect ELISA for the detection of human IgG4 antibodies to the filarial recombinant antigen, Bm14[4,5,6]. Added sensitivity and specificity result from the use of a monoclonal antiÏ IgG4 indicator. The test is designed to be used with serum samples as well as blood spot eluates collected on filter paper in the field.

INTENDED USE AND PRINCIPLE OF THE TEST

This test is an indirect ELISA for the detection of Bm14 specific IgG4 antibody. Antibody is bound by the recombinant antigen Bm14 coated on the inner surface of the test strip. Peroxidase-conjugated antibody to human IgG4 is added and reacts with bound antibody. A chromogenic substrate for peroxidase is added. If antibody to LF is present there is a reaction which results in the development of a blue colour, which is in proportion to the serum level of the antibody. Addition of stopping solution changes the blue colour to yellow.

CONTENTS OF THE KIT

FAMW	Celisa Plate Ï 1x96 wells - (single use only)	5 plates
CONTROL +	Positive Control	0.05mL
CONTROL -	Negative Control	0.05mL
FASD	Sample Diluent (10x)	60mL
FAPO	Enzyme Conjugate (100x)	0.6mL
FACD	Conjugate Diluent	60 mL
FAPT	PBS/Tween (20x)	250mL
FASC	Substrate Chromogen (TMB) (20x)	3.0mL
FASB	Substrate Buffer	60mL
FASS	Stopping Solution	30mL

Store all components at 2-8^{O}C.Expiry dates are clearly marked on each kit component and on the box. Expiry dates do not change once opened.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Micropipettes and tips; clean glassware or plastic containers for solutions; humid chamber; ELISA washer; and Spectrophotometer to read absorbances at a single wavelength of 450nm.

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only. Reagents should not be used after the expiry date shown on the label. If protective packaging is damaged, contact your local distributor and ask for a replacement. Do not mix reagents from different kits. Thimerosal preservative added to some components is a poison. Exercise caution when handling these components. The stopping solution is corrosive. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Dispense all reagents with care to avoid cross contamination of wells. Avoid exposure of the substrate to light. Treat all clinical and control material as though potentially infectious and dispose of in accordance with local operating regulations. For further information, please refer to the Material Safety Data Sheet.

INSTRUCTIONS FOR USE

Preparation of Wash Buffer

If crystals are present, warm the concentrate to dissolve. For each microplate, add 50mL PBS-Tween concentrate FAPT to 950mL of distilled water. Label the bottle WASH BUFFER. Store at 2-8^{o}C.

Preparation of Sample Diluent

Prepare the working Sample Diluent FASD (1x) by diluting the 10x Concentrate in distilled water. Mix the buffer thoroughly before using to dilute test samples.

Preparation of Samples

Serum or Plasma

Collect patient blood samples by standard venipuncture procedure. The test may be used with serum or plasma. The serum or plasma should be stored below -10^{o}C if the analysis is delayed. Prepare a 1/100 dilution of the positive control CONTROL +, the negative control CONTROL - and the patient specimens using the prepared Sample Diluent FASD (1x) above, ensuring proper mixing. Record the position of each diluted SAMPLE on a work sheet.

Blood Spot Eluates

The recommended filter paper for use is the TropBio filter paper (WHO format). Each filter paper circle absorbs ~10uL of blood. Upon drying at room temperature, the spotted blood circles should be stored at 2-8 ^{o}C for short term storage and transportation or -20^{o}C in a freezer for long term storage until ready for testing. Prepare to elute the sample by carefully removing one circle and completely immersing in a tube of 500uL of prepared working Sample Diluent FASD (1x). Leave the samples refrigerated at 2-8 ^{o}C overnight. The following day, vortex the contents of the tube to ensure complete elution of sample. The eluate is equivalent to a 1/100 serum dilution and can be used in the Bm14 Antibody CELISA assay without further dilution.

Assay Procedure

1. Bring all reagents to room temperature (18-25 ^{o}C) before use.
2. Prepare WASH BUFFER (see Preparation of Wash Buffer).
3. Prepare the working Sample Diluent FASD (1x) (See Preparation of Sample Diluent).
4. Remove required number of FAMW strips. Reseal the foil bag containing unused microwell strips immediately with tape.
5. Pipette 100µL of the SAMPLE, CONTROL + and CONTROL -, into individual microwells. Include two positive and two negatives in each assay run. Cover and incubate for one (1) hour at 37 ^{o}C in a humid chamber. (see Preparation of Samples using serum, plasma or blood spot from filter paper).
6. In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength CONJUGATE. Add 10µL of Enzyme Conjugate FAPO to 990µL of FACD and mix thoroughly (allow 1mL per strip of 8 wells).
7. Wash the wells preferably using an automatic plate/strip washer or manually as follows:
   - Empty contents from the wells. Refill with the WASH BUFFER.
   - Repeat this process a further three (3) times. After the fourth wash, bang inverted wells dry on absorbent tissue.
   - NB: take care when flicking out plates, hold side of frame firmly to hold strips in place.

8. Add 100µL of CONJUGATE to each well. Incubate for 45 minutes at 37 °C in a humid chamber.
9. In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength SUBSTRATE. Add 50µL of Substrate Chromogen FASC to 950µL of Substrate Buffer FASB and mix thoroughly (allow 1mL per strip of 8 wells). The stability of the solution is 30 minutes.
10. Repeat washing as in step 7.
11. Add 100µL of fresh SUBSTRATE and incubate in the dark (covered) at room temperature for 15 minutes.
12. Add 100µL of Stopping Solution FASS. Tap the plate to mix.
13. Read the results visually or in a spectrophotometer at 450nm or 450/620 nm.

READING AND INTERPRETATION OF RESULTS AND DIAGNOSIS

Photometrically

It is optimal to use a dual beam ELISA reader. Blank machine against the well designated as the blank. Within 30 minutes of stopping the reaction read absorbance of all wells including all the controls at 450nm on an ELISA reader.

For the test results to be accepted the controls must read as follows:

Control	O.D Value (450/620nm)
Negative Control	< 0.20
Positive Control	> 0.40

Note: A cut-off value can be determined by testing a panel of known negative samples. Cut-off value = mean + 3 Standard Deviations (+3SD). A pilot study conducted in- house with 50 blood spot eluates from Australian residents without prior exposure to LF gave a cut-off of 0.25 OD units (mean +3SD)

Visual Reading

Results can also be read visually. Note colour of the specimen wells and compare with the colour of the negative control. If the colour, read visually, of a specimen well is above that of the negative control, then the specimen contains antibody.

WASTE DISPOSAL

Dispose of any unused components as biohazardous waste. For more information, please refer to the MSDS.

SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE BM14 ANTIBODY CELISA KIT

Data on the Bm14 Antibody CELISA test performance can be obtained from your local distributor or by contacting Cellabs.

INDEMNITY NOTICE

Modifications or changes made in the recommended procedure may affect the stated or implied claims. A positive or negative result does not preclude the presence of other underlying causative agents. Cellabs and its agents and distributors shall not be liable for damages under these circumstances

---

Français

Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody CELISA

PREAMBULE

Lâagent de la filariose lymphatique (FL) est la filaire *Wucheria bancroftii*,qui est transmise par un moustique et qui infecte plus de 100 millions de personnes dans plus de 83 pays du monde[1]. Plus dûun milliard de personnes risquent cette infection qui dans son stade chronique (éléphantiasis) a de profondes conséquences physiques, sociales et économiques et représente la quatrième cause dîhandicap permanent au monde. Lœradication de cette maladie par lœOMS est prévue en lânnée 2020 grâce à un programme de chimiothérapie de masse (CTM)[2] opéré par les pays affectés en collaboration avec lœAlliance Globale pour lœElimination de la Filariose Lymphatique (AGEFL).

Afin de suivre lœefficacité du programme dœradication FL, un nombre dûoutils diagnostics ont été employés, y compris la mesure de la microfilarémie et dâantigènes parasitaires par dosages immunologiques, en formats rapides et ELISA. Les anticorps spécifiques IgG4 anti-filariose ont également été proposés comme marqueurs efficaces de lînterruption de la transmission FL, en particulier chez les jeunes enfants[3].

La trousse Bm14 Antibody CELISA est un ELISA indirecte pour détecter les anticorps IgG4 humains de lâantigène recombinant Bm14[4,5,6]. Lûusage dûun anticorps monoclonal de détection anti-IgG4 augmente la sensibilité et la spécificité du dosage. Le test est conçu pour usage sur échantillons de sérum ainsi que sur échantillons dœlution de gouttes de sang sur papier filtre collectés sur le terrain.

PRINCIPE DU TEST ET INDICATIONS D'EMPLOI

Ce test est un ELISA indirecte pour détecter les anticorps IgG4specifiques Bm14. Lâanticorps est lié par lâantigène recombinant Bm14 fixé sur la surface interne des puits de dosage. Un anticorps anti-IgG4 humain conjugué à la peroxydase est ajouté et réagit avec lâanticorps immobilisé. Un substrat chromogène pour peroxydase est ajouté. Si lâanticorps LF est présent, une réaction se produit conduisant au développement dûne couleur bleue, dîntensité proportionnelle au niveau dâanticorps dans le sérum. Lâaddition dûun réactif dâarrêt change la couleur au jaune.

COMPOSITION DU COFFRET

FAMW	Plaque CELISA ï 1x96 puits (usage unique)	5 plaques
CONTROL +	Contrôle positif	0.05mL
CONTROL -	Contrôle négatif	0.05mL
FASD	Réactif de dilution des échantillons (10x)	60mL
FAPO	Conjugué enzymatique (100x)	0.6mL
FACD	Diluant de conjugué enzymatique	60 mL
FAPT	PBS/Tween (20x)	250mL
FASC	Substrat chromogène (TMB) (20x)	3.0mL
FASB	Tampon du substrat	60mL
FASS	Solution dâarrêt	30mL

Conserver tous les composants à 2-8°C. Les dates de péremption sont clairement marquées sur chaque composant et sur le coffret de la trousse. Lûouverture nâaltère pas les dates de péremption.

MATERIELS REQUIS NON FOURNIS

Micropipettes et embouts; verrerie propre ou récipients plastiques pour solutions; eau distillée; chambre humide; laveur ELISA; spectrophotomètre capable de lire à 450 nm.

PRECAUTIONS

Produit à usage uniquement *in vitro*. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur lœtiquette. Si lœmballage est abîmé, contactez votre fournisseur local pour un remplacement. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets différents. Certains réactifs contiennent du Thimerosal comme préservatif, qui est un poison. Manipulez ces réactifs avec soin. La solution dâarrêt est corrosive. Evitez tout contact avec la peau, les yeux ou les membranes muqueuses. Ajouter les réactifs en évitant tout risque de contamination croisée des puits. Eviter dœexposer le substrat à la lumière. Les échantillons cliniques et les contrôles doivent être considérés comme potentiellement infectieux

infectieux et jetés selon les procédures en vigueur. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

INSTRUCTIONS D'EMPLOI

Préparation du tampon de lavage

Si des cristaux apparaissent dans le concentré, réchauffer le réactif pour les dissoudre. Pour chaque plaque de micropuits, ajouter 50mL de concentré PBS/Tween FAPT à 950mL de l'eau distillée. Libeller la bouteille WASH BUFFER. Conserver à 2-8°C.

Préparation du réactif de dilution des échantillons

Préparer la dilution de travail du réactif de dilution des échantillons FASD (1x) en diluant le concentré x10 avec de l'eau distillée. Mélanger le tampon vigoureusement avant usage sur échantillons à tester.

Préparation des échantillons

Sérum ou plasma

Collecter les spécimens sanguins par ponction veineuse courante. Le dosage peut se faire sur plasma ou sérum. Conserver les échantillons de plasma ou sérum à -10°C si l'analyse est retardée. Préparer une dilution au 1/100 du contrôle positif CONTROL +, du contrôle négatif CONTROL - et des échantillons patients à l'aide du réactif WASH BUFFER et bien mélanger. Repérer la position des échantillons dilués SAMPLE sur la feuille de travail.

Elution de gouttes de sang sur papier filtre

L'emploi du papier filtre TropBio (format OMS) est recommandé. Chaque cercle de papier filtre absorbe ~10uL de sang. Apres séchage à température ambiante, les papiers filtres utilisés doivent être conservés à 2-8°C à court terme ou au congélateur à -20°C pour un stockage de plus longue durée jusqu'à leur emploi. Eluer les échantillons en retirant délicatement un cercle et en l'immergent dans un tube de 500uL de solution de travail de réactif de dilution des échantillons FASD (1x). Laisser les échantillons au réfrigérateur à 2-8°C durant la nuit. Le lendemain, agiter au vortex le contenu du tube d'élution de l'échantillon. Cette élution est équivalente à une dilution du sérum au 1/100 et peut être utilisée dans la trousse Bm14 Antibody CELISA sans dilution supplémentaire.

Mode D'emploi

1. Ramener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant l'emploi.
2. Préparer le WASH BUFFER (voir Préparation du Tampon de Lavage).
3. Préparer la solution de travail FASD (1x) (voir Préparation du Reactif de Dilution des Echantillons).
4. Retirer le nombre requis de micropuits FAMW. Immédiatement refermer le sac contenant les micropuits restants avec du ruban adhésif.
5. Ajouter 100µL de SAMPLE, de CONTROL + et de CONTROL - dans leurs micropuits individuels. Inclure deux contrôles positifs et deux contrôles négatifs dans chaque série de dosage. Couvrir et incuber une (1) heure à 37°C en chambre humide. (voir Préparation des Echantillons ï Elution de gouttes de sang sur papier filtre)
6. Dans les 10 dernières minutes de l'incubation, préparer la solution de travail de CONJUGATE. Ajouter 10µL de Conjugué enzymatique FAPO à 990µL de FACD et mélanger vigoureusement (prévoir 1mL de solution de travail par barrette de 8 micropuits).
7. Laver les micropuits au laveur automatique ou manuellement comme suit :
   - Vider le contenu des micropuits. Remplir les micropuits de WASH BUFFER.
   - Répéter l'opération trois (3) fois. Vider le contenu des puits après le quatrième lavage.
   - NB : opérez cette étape avec précaution, en serrant le cadre de la plaque à micropuits pour éviter qu'ils ne s'en délogent.
8. Ajouter 100µL de CONJUGATE dans chaque puits. Incuber 45 minutes à 37°C en chambre humide.
9. Dans les 10 dernières minutes de l'incubation, préparer la solution de travail de SUBSTRATE. Ajouter 50µL de Substrat chromogène FASC à 950µL de Tampon de substrat FASB et mélanger vigoureusement (prévoir 1 mL de solution de travail par barrette de 8 micropuits). Cette solution de travail est stable pendant 30 minutes.
10. Répéter le lavage comme à l'étape 7.
11. Ajouter 100µL de SUBSTRATE frais et incuber (couvert) à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.
12. Ajouter 100µL de solution d'arrêt FASS. Taper la plaque pour mélanger.
13. Lire les résultats visuellement ou au spectrophotomètre à 450nm ou à 450/620nm.

LECTURE, INTERPRETATION DES RESULTATS ET DIAGNOSTIC

Lecture spectrophotométrique

Il est préférable d'utiliser un spectrophotomètre à double longueur d'onde. Calibrer la machine contre un blanc désigné. Lire l'absorbance de chaque puit y compris contrôles dans un lecteur à microplaque ELISA dans les 30 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt. Pour être valides, les valeurs des contrôles doivent être comme suit :

Contrôle	Valeur D.O. (450/620 nm)
Contrôle négatif	< 0.20
Contrôle positif	> 0.40

Note: Un seuil discriminant peut être déterminé à l'aide d'un groupe d'échantillons négatifs confirmés. Seuil discriminant = moyenne + 3 Déviations Standard (+ 3 DS). Une étude pilote effectuée par Cellabs sur 50 échantillons sanguins d'élution sur papier filtre provenant de résidents Australiens sans exposition préalable à FL a produit un seuil discriminant de 0.25 unités DO (moyenne + 3 DS).

Lecture visuelle

Les résultats peuvent être lus visuellement. Observer l'intensité couleur des échantillons en comparaison à celle du contrôle négatif. Si un échantillon présente une couleur visuellement clairement supérieure à celle du contrôle négatif, cet échantillon contient des anticorps.

DECHETS

Jetez tout composant inutilisé dans la poubelle aux déchets biologiques. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

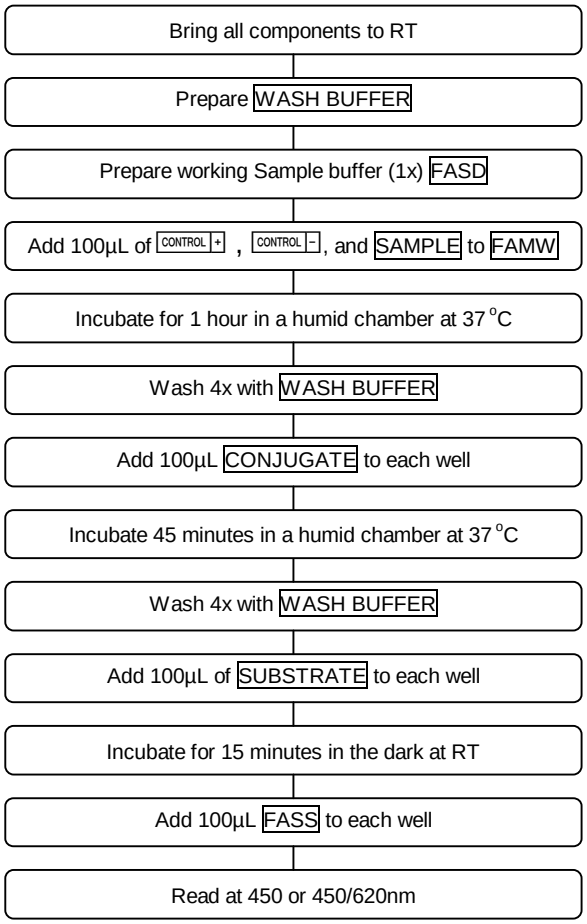
SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST

Des données sur la performance du test Bm14 Antibody CELISA sont disponible auprès de votre distributeur local ou en contactant Cellabs.

NOTICE D'INDEMNITE

Toute modification ou variation du protocole d'emploi recommandé peut affecter les performances annoncées du produit. Un résultat positif ou négatif n'exclue pas la présence d'autres agents causatifs sous-jacents. Cellabs et ses agents et distributeurs ne sont légalement responsables d'aucun dommage dans de telles circonstances.

FIGURE 1 Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody CELISA DIAGRAM FOR USE


Bring all components to RT
Prepare WASH BUFFER
Prepare working Sample buffer (1x) FASD
Add 100µL of CONTROL + , CONTROL -, and SAMPLE to FAMW
Incubate for 1 hour in a humid chamber at 37 °C
Wash 4x with WASH BUFFER
Add 100µL CONJUGATE to each well
Incubate 45 minutes in a humid chamber at 37 °C
Wash 4x with WASH BUFFER
Add 100µL of SUBSTRATE to each well
Incubate for 15 minutes in the dark at RT
Add 100µL FASS to each well
Read at 450 or 450/620nm

EXPLANATION OF SYMBOLS
EXPLICATION DES SYMBOLES

Consult Instructions for Use
Consultez le mode dœmploi

IVD
In Vitro Diagnostic Medical Device
Diagnostic medical *in-vitro*

2°C 8°C
Temperature Limitation
Limites de temperature

LOT
Batch
Lot

CONTROL +
Control Positive
Contrôle positif

CONTROL -
Control Negative
Contrôle négatif

Use By/Expiration Date
Date de péremption

Do Not Re-use
Ne pas ré-utiliser

Cellabs Pty Ltd
Unit 7, 27 Dale Street (PO Box 421)
Brookvale, NSW 2100 Australia
Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426
Web: http://www.cellabs.com.au
Email: sales@cellabs.com.au

EC REP
WMDE
Bergerweg 18
6085 AT Horn
The Netherlands

Insert Version / Version mode dœmploi
en fr
LF3.06
6 March 2012

CE 0843

References:

1. Weil GJ & Ramzy RMR (2006) Diagnostic tools for filariasis elimination programs. Trends Parasitol 23: 78-82.
2. Ramzy RMR, Setouhy M El, Helmy H et al. (2006) Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. Lancet 367: 992-999.
3. Ottesen EA, Skvaril F, Tripathy SP, Poindexter RW, Hussain R, (1985) Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human Filariasis. J.Immunol 134,2707-2712.
4. Chandrashekar R, Curtis KC, Ramzy RM et al.(1994) Molecular cloning of Brugia malayi antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. Mol Biochem Parasitol 64: 261-274.
5. Ramzy RM, Helmy H, Faris R et al. (1995) Evaluation of a recombinant antigen-based antibody assay for diagnosis of bancroftian filariasis in Egypt. Ann Trop Med Parasitol 89: 443-446.
6. Lammie P, Weil G, Rahmah N et al. (2004) Recombinant antigen based assay for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis – a multicenter trial. Filaria Journal 3: 9